

检测牛分枝杆菌的噬菌体生物扩增法的建立及初步应用

钟志军^{1,3}, 彭广能^{1*}, 唐明霞², 白永平¹, 石梅¹, 马晓平¹,
胡忠义^{3*}, 王洁³, 秦莲花³, 杨华³

(1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 西南大学荣昌校区动物医学系, 重庆 400715; 3. 上海市结核重点实验室, 上海 200433)

摘要: 建立噬菌体生物扩增法(PhaB)检测牛分枝杆菌, 将建立的方法用于 22 株牛分枝杆菌临床分离株及 20 种常见非结核分枝杆菌(NTM)及 5 种非分枝杆菌, 同时对 203 头疑似牛结核病奶牛的奶样进行检测, 其结果与皮内变态试验、涂片法、罗氏培养进行比较。结果表明, 噬菌体工作浓度为 1×10^9 PFU/mL、37°C 感染 2 h 为最佳检测条件; 杀毒剂浓度为 100 mmol/L, 室温作用 10 min 即可完全杀灭受试噬菌体; 加热灭活的细菌和指示细菌不被噬菌体感染; 牛分枝杆菌、耻垢分枝杆菌和 22 株牛分枝杆菌临床分离株检测结果均为阳性, 16 种 NTM 和 5 种非分枝杆菌为阴性, 4 种 NTM(偶然、胞内、金色、草分枝杆菌)在高浓度时($>10^5$ CFU/mL)检测结果为阳性; 该法可检测出 60~120 CFU/mL 牛分枝杆菌; 批内、批间变异系数均小于 15%, 重复性良好; 203 头检测奶牛中, PhaB 法、涂片法、皮内变态试验和罗氏培养结果分别有 14 头(6.9%)、17 头(8.4%)、21 头(10.3%)和 12 头(6.0%)为阳性, PhaB 法与其他 3 种方法比较, 阳性准确性、特异性都在 96% 以上, 敏感性在 71%~100%。该法检测牛分枝杆菌具有快速、简便、灵敏、特异性高等特点。

关键词: 分枝杆菌噬菌体; 牛分枝杆菌; 检测方法; 牛乳

中图分类号: S852.61⁺8; R446.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)11-1224-06

Establishment and Preliminary Application of Detection of *Mycobacterium bovis* by Phage Amplified Biologically Assay

ZHONG Zhi-jun^{1,3}, PENG Guang-neng^{1*}, TANG Ming-xia², BAI Yong-ping¹,
SHI Mei¹, MA Xiao-ping¹, HU Zhong-yi^{3*}, WANG Jie³, QIN Lian-hua³, YANG Hua³

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. TB Key Laboratory of Shanghai, Shanghai 200433, China)

Abstract: A technique for detection of *Mycobacterium bovis* by PhaB assay was developed, and the method was applied to detect 22 clinical isolates of *Mycobacterium bovis*, 20 non-Mtb strains of Mycobacteria and 5 other bacteria. 203 cow milk samples were detected by PhaB assay and the results were compared with skin test, smear method and Löwenstein-Jensen culture. It was demonstrated that the optimal working concentration of mycobacteriophage was 1×10^9 PFU/mL and the optimal condition for detection was infection at 37°C for 2 hours. Meanwhile, the concentration of virucidal agent to inactivate the mycobacteriophage completely was 100 mmol/L at room temperature for 10 min, and 4 mg/mL concentration of the logarithmic phage of mycobacterioph-

收稿日期: 2006-12-15

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划资助项目(044119638)

作者简介: 钟志军(1980-), 男, 四川双流人, 博士生, 主要从事反刍动物疾病学研究, E-mail: zhongzhijun488@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 彭广能(1966-), 男, 土家族, 重庆石柱人, 博士生, 副教授, 硕士生导师, 主要从事临床兽医学教学及科研工作, E-mail: pgn.sicau@163.com; 胡忠义, Tel: 021-65115006-3037, E-mail: shtblab@163.com

age was selected as the working concentration. Under these conditions, the optimal results could be obtained, and the heat-inactivated or indicated bacteria were not infected with mycobacteriophage. The positive results could be obtained by using this method of detection for control strain of *M. bovis*, *M. smegmatis* and 22 clinical isolates of *M. bovis*, but the negative results were demonstrated in 16 reference strains of non-Mtb strains of Mycobacteria and 5 other bacteria. The 4 strains of NTM (*M. fortuitum*, *M. intrcellulare*, *M. aurum*, *M. phlei*) can be positive reaction at concentration of high level ($>10^5$ CFU/mL). By using this method 60-120 CFU/mL of *M. bovis* could be detected. The intra- and inter-batch variation coefficients were all below 15%, indicating a good repeatability. In all milk samples from 203 cows, 14, 17, 21 and 12 were detected positive by PhaB assay, smear method, skin test and Löwenstein-Jensen culture respectively. The correspondence rate and specificity of phaB method compared to other three methods were all above 96%, the sensitivity was between 71%-100%. Rapidity, simplicity, sensitivity and high specificity enable PhaB assay can be used for detecting *Mycobacterium bovis*.

Key words: Mycobacteriophage; *Mycobacterium bovis*; detect method; milk

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 引起的一种人兽共患的慢性传染病, 对人和动物的健康造成极大的危害。牛结核病 (Bovine Tuberculosis) 主要由牛分枝杆菌引起, 该病可通过吸入含菌气溶胶或食用受污染的乳制品而感染人^[1,2], 人结核病中有 7%~10% 由牛分枝杆菌引起, 有的地区儿童感染牛分枝杆菌高达 33%^[3,4]。这些病例与食用未消毒的粗制奶产品有关, 因此检测牛乳中的牛分枝杆菌对控制结核病十分重要。

牛结核病的防治主要采用 PPD 进行变态反应检疫, 对检测阳性牛进行隔离或扑杀, 以达到消灭该病的目的。但该病并未得到有效控制, 近年来反而呈上升趋势^[5]。目前普遍采用卡介苗 (BCG) 免疫, 但注射 BCG 后变态反应均呈阳性, 导致人工免疫和自然感染难以区分, 影响牛的检疫工作^[6]。因此建立快速、简易检测牛结核病的方法势在必行。

噬菌体生物扩增法 (Phage Amplified Biologically Assay, PhaB) 是 Wilson 等^[7] 于 1997 年建立的一种 MTB 快速检测新技术, 该法在结核分枝杆菌的检测中已有报道^[8-10], 但尚未用于牛乳中牛分枝杆菌的检测。笔者应用分枝杆菌噬菌体 D29 对试验条件中各因素进行研究, 建立牛乳中牛分枝杆菌快速检测技术, 并对该法进行了初步应用。

1 材料与方法

1.1 材料

牛分枝杆菌标准株 (ATCC19210)、指示细菌为耻垢分枝杆菌 (ATCC607)、分枝杆菌噬菌体

D29, 22 株牛分枝杆菌临床分离株均由上海市结核重点实验室提供^[10]; 203 份疑患牛结核病临床乳样由上海市兽医站协助提供; 20 种常见非结核分枝杆菌 (NTM), 包括戈登、瘰疬、淡黄、蟾蜍、爱知、马尔摩、堪萨斯、土地、次要、溃疡、不产色、嗜血、母牛、龟、鸟、偶然、胞内、金色、草和胃分枝杆菌均来自卫生部结核病控制中心; 5 种乳中常见非分枝杆菌 (金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、大肠杆菌、双歧杆菌、乳房链球菌) 由上海市临检中心提供; Middlebrook 7H9 液体培养基购自美国 BD 公司, 营养添加剂 (OADC) 和改良罗氏培养基由本室自制。琼脂粉为日本进口分装试剂; 硫酸亚铁胺 (FAS) 为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体生物扩增法各检测条件的建立 参照文献^[9], 取 0.1 mL 噬菌体与 1 mL 待检菌液作用一定时间, 加入 0.1 mL 杀毒剂, 混匀, 室温作用一段时间, 加入 5 mL 液体培养基和 1 mL 指示细胞, 混匀后与等量融化琼脂混合浇注平板, 冷却、成型后置 37°C 培养 18~24 h, 计算噬菌斑数目。每次检测设杀毒剂、阴性及阳性对照。

1.2.1.1 牛分枝杆菌作用浓度的选择: 将牛分枝杆菌标准株在液体培养基中培养 2~3 周后, 麦氏比浊到 5.0×10^7 CFU/mL, 作 1:2 000、1:5 000、1:10 000 倍稀释后待检。

1.2.1.2 噬菌体与牛分枝杆菌感染效率的关系: 取菌悬液加入噬菌体, 37°C 感染 0、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6 h 后, 隔夜计算噬菌斑数目。

1.2.1.3 噬菌体作用浓度和感染时间的选择:噬菌体浓度在 $10^5 \sim 10^{10}$ PFU/mL, 37°C 感染 0、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3 h 后,隔夜计算噬菌斑数目。

1.2.1.4 钙离子在噬菌体侵染时浓度的选择:将反应管中分别加 0、0.5、1、1.5、2 mol/L CaCl_2 0.1 mL,然后加噬菌体进行检测,隔夜计算噬菌斑数目。

1.2.1.5 杀毒剂浓度和作用时间及温度选择:室温和 37°C 将不同浓度的杀毒剂(25、50、100、200、400 mmol/L)与 1×10^9 PFU/mL 的噬菌体作用不同时间(5、10 min),隔夜计算噬菌斑数目。

1.2.2 灵敏度试验 将牛分枝杆菌浓度调至 1 mg/mL(相当于 5.0×10^7 CFU/mL),作 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 倍比稀释,吸取各稀释度菌液 1 mL 分别与噬菌体作用 2 h,然后浇板检测,计算噬菌斑数目。同样的菌液浓度,吸 0.1 mL 接种 7H9 米氏琼脂平板 37°C 培养,每个浓度接种 2 支培养基。每周观察 1 次,培养 4 周后计算菌落形成单位(CFU/mL)。

1.2.3 特异性试验 死菌和活菌的检测:将牛分枝杆菌和指示细菌 100°C 灭活 10 min,然后加入噬菌体检测,并以未经加热的细菌为对照;参考菌株检测:牛分枝杆菌和指示细菌,20 种常见 NTM 参考菌株和 5 种乳中常见非分枝杆菌。

1.2.4 重复性试验 每天用 PhaB 法将牛分枝杆菌检测 5 次,连续 5 d,计算批内、批间变异系数。

1.2.5 牛分枝杆菌临床分离株和临床奶样的检测 用建立的 PhaB 法对牛分枝杆菌标准株、22 株牛分枝杆菌临床分离株和 203 头奶牛的奶样进行检测。

1.2.6 皮试检查方法 参考文献[11]进行,参照《牛结核病提纯结核菌素变态反应操作规程》标准判定。

1.2.7 细菌抗酸染色和培养 参照《结核病细菌学检验规程》进行分枝杆菌的涂片和培养。涂片采用牛乳和口腔分泌样进行,一种涂片阳性即报阳性结果;分离培养采用改良罗氏培养基进行。

2 结果

2.1 牛分枝杆菌最佳浓度的选择

将 5.0×10^7 CFU/mL 牛分枝杆菌作 1 : 10 000 稀释后,噬菌斑数目与其它两个稀释度相比明显减少($P < 0.01$);1 : 5 000 稀释时,噬菌斑的数目与 1 : 10 000 比较,差异显著($P < 0.01$),与 1 : 2 000 比较差异不显著($P > 0.05$);1 : 2 000 稀

时,噬菌斑明显增多且有部分融合,计数困难;为保证该方法具有较高的灵敏度,选择菌液浓度 1 : 5 000 稀释,噬菌斑在 400 ~ 500 个便于计数。详见图 1。

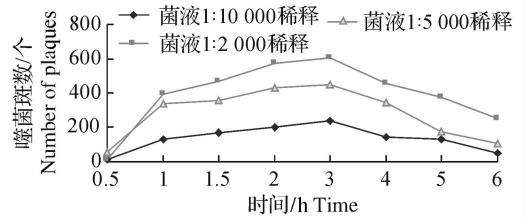


图 1 不同浓度菌悬液与噬菌体作用不同时间形成的噬菌斑数目

Fig. 1 The numbers of plaques that different concentration of *M. bovis* was infected with mycobacteriophage in various time

2.2 噬菌体与牛分枝杆菌感染效率的关系

感染 0.5 h,噬菌体与牛分枝杆菌作用产生的噬菌斑数目小于 100,与其它时间相比,差异极显著($P < 0.01$);感染 1 ~ 1.5 h,噬菌斑虽较 0.5 h 有显著增加,但未达到高峰;感染 2 ~ 3 h,噬菌斑维持在最多水平,且 2 h 与 2.5、3 h 产生的噬菌斑相比,没有统计学差异($P > 0.05$);3 h 后,噬菌斑数目明显减少,与 2、2.5、3 h 相比有极显著差异($P < 0.01$)。从快速检测角度考虑,选择噬菌体与牛分枝杆菌作用 2 h 为噬菌体的最佳侵染时间。

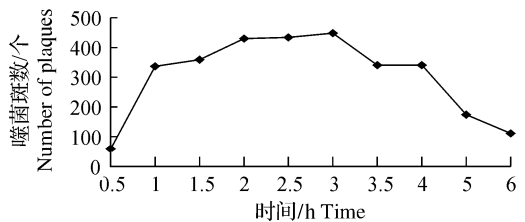


图 2 噬菌体感染牛分枝杆菌效率随时间的变化规律

Fig. 2 The numbers of plaques of *M. bovis* infected with mycobacteriophage in various time

2.3 噬菌体作用浓度和感染时间的选择

噬菌体浓度在 $10^7 \sim 10^{10}$ PFU/mL 时感染牛分枝杆菌,所产生的噬菌斑数目在不同作用时间都多于噬菌体浓度 $10^6 \sim 10^5$ PFU/mL 时形成的噬菌斑数目,与之相比差异显著($P < 0.05$);噬菌体浓度为 10^9 PFU/mL 时感染牛分枝杆菌产生的噬菌斑数目达到最大,再增加噬菌体浓度,噬菌斑数目无明显增

加,感染 1.5~2.5 h 时,噬菌斑数目较 0.5~1.0 h 时明显增多($P < 0.05$),3 h 时噬菌斑较 1.5~2.5 h 减少,因此噬菌体最佳作用时间为 2.0 h,浓度为 10^9 PFU/mL。详见图 3。

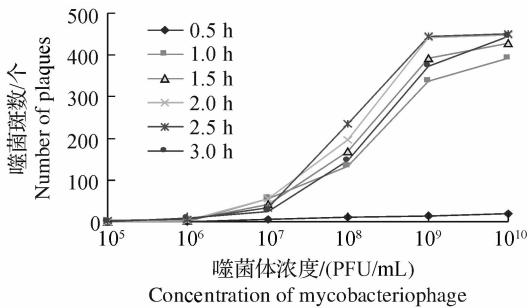


图 3 不同浓度的噬菌体与牛分枝杆菌作用不同时间的噬菌斑数变化

Fig. 3 The numbers of plaques that *M. bovis* was infected with different concentration of mycobacteriophage in various time

2.4 噬菌体感染时钙离子浓度的选择

加钙组的噬菌斑数目明显多于无钙组($P < 0.01$);在含有 1 mol/L CaCl_2 组中,噬菌斑数目最多,减少或增加 CaCl_2 的浓度,均使噬菌斑数目减少。因此,噬菌体感染时每毫升作用液中含 1 mmol

的 CaCl_2 效果最好。

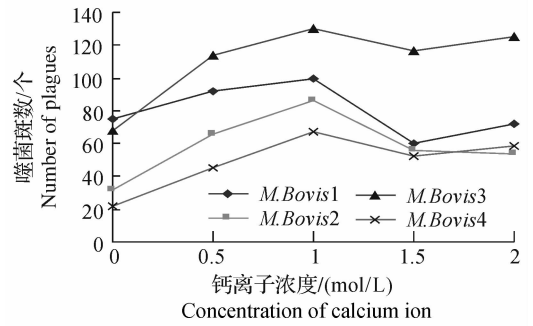


图 4 钙离子对噬菌体作用的影响

Fig. 4 The effect of calcium chloride on infection of mycobacteriophage

2.5 FAS 浓度、作用时间及温度选择

如表 1 所示,杀毒剂浓度在 25、50 mmol/L 时,无论放置室温或 37℃ 作用 10 min,都不能有效地杀灭游离的噬菌体;杀毒剂浓度在 100 mmol/L 时,室温或 37℃ 作用 5 min 时仍有部分噬菌体不能杀灭,作用 10 min 可以完全杀灭游离的噬菌体。室温和 37℃ 作用没有显著性差异($P > 0.05$)。浓度在 200 mmol/L 及以上时,能有效杀灭游离的噬菌体,但抑制指示细菌的生长,影响噬菌斑观察。

表 1 不同浓度 FAS 在室温和 37℃ 作用不同时间形成的噬菌斑数目($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The numbers of plaques induced by mycobacteriophage with different concentration of virucidal agent at room temperature and 37℃ ($\bar{x} \pm s$)

杀毒剂浓度/(mmol/L) Virucidal agent concentration	37℃		室温(23℃)	
	Thirty seven centi-degree		Room temperature	
	5 min	10 min	5 min	10 min
25	53.7±8.5	38.3±9.1	25.3±8.1	13.3±3.5
50	1.3±0.6	1.7±1.2	2.3±1.2	1.0±1.0
100	2.0±1.7	0.0±0.0	2.0±1.0	0.0±0.0
200	0.7±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
400	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

2.6 灵敏度试验

结果判定以大于 10 个噬菌斑为阳性结果。结果表明,牛分枝杆菌的活菌数为 60~120 CFU/mL 即可被检出。

2.7 特异性试验

加热灭活的细菌检测结果均为阴性,而活菌检测均为阳性;参考菌株牛分枝杆菌和指示细菌的噬菌体检测结果均为阳性;16 种常见 NTM 参考株和 5 种非分枝杆菌检测结果均为阴性,偶然、胞内、金

色、草分枝等 4 种 NTM 在高浓度时($> 10^5$ CFU/mL)检测结果为阳性。

2.8 重复性试验

批内变异系数为 6.4%、批间变异系数为 11.9%。批内、批间变异系数均小于 15%,重复性良好。

2.9 临床应用检测结果

2.9.1 牛分枝杆菌标准株和 22 株临床分离株检测结果 在优化条件下,即噬菌体工作浓度为 1×10^9

PFU/mL、37℃ 感染 2 h, 杀毒剂浓度在 100 mmol/L, 室温作用 10 min, 对参考牛分枝杆菌标准株(ATCC19210)和 22 株临床分离株检测, 结果均为阳性。

2.9.2 203 头奶牛奶样几种方法检测结果比较

203 头奶牛奶样检测结果中, PhaB 法与涂片、皮内变态试验和罗氏培养比较(表 2), 分别有 14 头(6.9%)、17 头(8.4%)、21 头(10.3%)和 12 头(6.0%)为阳性。以皮内变态试验为判断标准, 两种方法均为阳性 14 头、阴性 182 头, 有 7 头两法检测结果不符, 噬菌体法检测敏感性为 100.0%(14/14), 特异性为 96.3%(182/189), 阳性预测值

(PPV)为 66.7%(14/21), 阴性预测值(NPV)为 100.0%(182/182), 准确性为 96.6%(196/203); 以涂片检查为判断标准, 两种方法均为阳性 12 头、阴性 184 头, 有 7 头两法检测结果不符, 噬菌体法检测敏感性为 85.7%(12/14), 特异性为 97.4%(184/189), PPV 为 70.6%(12/17), NPV 为 98.9%(184/186), 准确性为 96.6%(196/203); 以罗氏培养为判断标准, 两种方法均为阳性 10 头、阴性 187 头, 有 6 头两法检测结果不符, 噬菌体法检测敏感性为 71.4%(10/14), 特异性为 98.9%(187/189), PPV 为 83.3%(10/12), NPV 为 97.9%(187/191), 准确性为 97.0%(197/203)。

表 2 PhaB 法与皮内变态试验、涂片和细菌培养检测结果比较

Table 2 The comparison results of PhaB assay to skin test, smear method and Löwenstein-Jensen culture

PhaB 法 Phage amplified biologically assay	皮内变态试验 Skin test			涂片检查 Smear method			罗氏培养 Löwenstein-Jensen culture		
	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total
	阳性 Positive	14	0	14	12	2	14	10	4
阴性 Negative	7	182	189	5	184	189	2	187	189
合计 Total	21	182	203	17	186	203	12	191	203

3 分析与讨论

细菌培养是诊断结核病的黄金标准, 但分离培养耗时长、分离率低; PPD 最大缺点是出现假阳性^[12]; 涂片法只能说明是分枝杆菌, 不能区分结核分枝杆菌复合群和非典型分枝杆菌; 免疫学方法简单, 但敏感性低, 特异性差; 分子生物学技术相对复杂, 对实验室条件和操作人员的要求较高, 不能鉴定死菌和活菌, 对经治疗后康复牛的检测, 其结果出现假阳性; 而本方法只检测活菌, 排除了死菌的干扰。

分枝杆菌噬菌体是一种专性寄生的分枝杆菌 DNA 病毒, 至今已发现 250 余种^[13], 具有严格的宿主特异性, 只能感染活菌。噬菌体的增殖速度较快, McNerney 等^[8]发现 D29 分枝杆菌噬菌体在耻垢分枝杆菌中 40~90 min 增殖一代, 在慢生长分枝杆菌中则需 3~6 h, 因此在 PhaB 中需加入快生长分枝杆菌来加速噬菌斑的形成以便于识别。笔者参照 Wilson 的方法建立了噬菌体法检测牛分枝杆菌, 并

对其检测条件进行研究。结果表明, 噬菌体与牛分枝杆菌感染 2~3 h 时, 可以获得最佳检测结果; 3 h 后噬菌斑数目减少, 是因为产生的子代噬菌体释放到菌体外, 被随后加入的 FAS 灭活所致; 噬菌体工作浓度及感染时间和温度对检测方法的灵敏度影响极大, 浓度过低灵敏度下降; 浓度过高, 多余的噬菌体被杀毒剂杀死, 灵敏度不变; 感染时间太短、温度偏低同样影响检测的灵敏度^[8]。噬菌体浓度在 1×10^9 PFU/mL 作用 2 h, 噬菌斑数目达到最高, 增加浓度和延长感染时间, 噬菌斑数目增加无显著性差异 ($P > 0.05$), 灵敏度不变。选择 2 h 为噬菌体感染时间, 该时间与注入胞内的噬菌体 DNA 最多的时间点相同, 保证了较高的灵敏度。因此, 选择噬菌体工作浓度为 1×10^9 PFU/mL、感染温度为 37℃、作用 2 h 为最佳检测条件。杀毒剂浓度和作用温度及时间对噬菌体的杀灭影响极大^[8]。本研究表明, 杀毒剂浓度在 100 mmol/L, 无论放置室温或 37℃, 作用 10 min 即可完全杀灭噬菌体, 因此选择 100

mmol/L 的杀毒剂室温作用 10 min 为检测条件。指示细菌浓度的高低直接影响噬菌斑的清晰度,选择 4 mg/mL 的对数生长期指示细菌为工作浓度,获得理想的检测结果。灵敏度试验表明,牛分枝杆菌的活菌数为 60~120 CFU/mL 即可被本法检出,显著高于涂片检测($10^3 \sim 10^4$ CFU/mL),灵敏度可与 PCR 技术相媲美^[11]。特异性试验表明该法特异性高,灭活细菌及 16 种常见分枝杆菌和 5 种非分枝杆菌检测结果均为阴性,偶然、胞内、金色、草分枝杆菌在高浓度时($>10^5$ CFU/mL)为阳性,在低浓度时($<10^5$ CFU/mL)为阴性,这与文献[14]报道的结果相符。

本研究所建立的 PhaB 法与其他三种方法比较,阳性准确性、特异性都在 96% 以上,敏感性在 71%~100%,说明该法与常规检测方法符合率高,特异性强,可用于临床。涂片和皮内变态试验阳性结果均高于 PhaB 法,可能由于假阳性结果造成。2 份罗氏培养和 PhaB 法检测结果不符合,经培养并进行菌型鉴定为草分枝杆菌和鸟分枝杆菌,说明 PhaB 法能区分草分枝杆菌和鸟分枝杆菌,或菌量少时不能检测($<10^5$ CFU/mL)。该法报告结果只需 18~24 h,明显短于罗氏培养和皮内变态试验报告时间。本法是将牛分枝杆菌菌体裂解,对控制实验室传播和控制牛分枝杆菌的传播有重要意义。当然,该研究目前还处于实验室研究阶段,需通过大量临床样本来考察该方法的各项指标。本法检测的是活菌,可为活动性结核病的诊断提供依据,对早期发现传染源、积极治疗和采取有效措施控制结核病的传播具有重要意义。此外本研究为噬菌体法快速诊断牛分枝杆菌试剂盒的研制提供了理论数据。

参考文献:

- [1] Grange J M. *Mycobacterium bovis* infection in human being [J]. Tuberculosis, 2001, (7):71~77.
- [2] Wedlock D N, Skinner M A, Lisle G W, et al. Review: Control of *Mycobacterium bovis* infection and the risk to human populations[J]. Microbes Infect, 2002, 4(4):471~480.
- [3] Shinnick T M. Diagnostic test needs for evaluating anti-tuberculosis vaccines[J]. Clinical Infectious Diseases, 2000, 30S:276~278.
- [4] Besser R E, Pakiz B, Schulte J M, et al. Risk factors for positive Mantoux tuberculin skin tests in children in san Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission [J]. Pediatrics, 2001, 108: 305~310.
- [5] Tollefsen S, Vordermeier M, Ulsen I, et al. DNA injection in combination with electroporation a novel method for vaccination of fanned ruminants[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2003, 57(3): 229~238.
- [6] Shinnick T M. Diagnostic test needs for evaluating anti-tuberculosis vaccines[J]. Clinical Infectious Diseases, 2000, 30:276~278.
- [7] Wilson S M, al-Suwaidi Z, McNERNEY R, et al. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nat Med, 1997, 3:465~468.
- [8] McNERNEY R, Wilson S M, Sishu A M, et al. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis* [J]. Res Microbiol, 1998, 149(7):487~495.
- [9] Seaman T, Trolip A, Mole R, et al. The use of a novel phage-based technology as a practical tool for the diagnosis of tuberculosis in Africa[J]. Africa J Biotech, 2003, 2(2):40~45.
- [10] 胡忠义,倪莲娣,靳安佳,等. 噬菌体生物扩增法快速检测结核分枝杆菌方法学研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27:801~805.
- [11] 蔡宏. 利用聚合酶链反应技术检测牛结核杆菌病研究[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(4):291~294.
- [12] 刘清河,王全凯,湖伟群,等. 应用变态反应方法诊断鹿结核病的研究[J]. 吉林农业大学学报, 1994, 46(2):69~73.
- [13] McNERNEY R. TB:the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 1999, 3:179~184.
- [14] Alcaide F, Gali N, Dominguez J, et al. Usefulness of a new mycobacteriophage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41:680~688.